

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Seminarski rad

Usmjerena evolucija triptofan-sintaze
Directed evolution of tryptophan synthase

Iva Buljan

Preddiplomski studij molekularne biologije

Undergraduate Study of Molecular Biology

Mentor: prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj

Zagreb, 2019.

Sadržaj

1.	Uvod	1
2.	Usmjerena evolucija kao metoda stvaranja novih enzima.....	2
2.1.	Temelji evolucije enzima	3
2.2.	Nastajanje varijacija u usmjerenj evolucion	4
2.3.	Selektivni pritisak na knjižnicu enzima	4
2.4.	Važnost usmjerene evolucije u korištenju katalitičkih podjedinica alosterički reguliranih enzimskih kompleksa	5
2.5.	Raznovrsne primjene usmjerene evolucije.....	5
3.	Usmjerena evolucija β podjedinice triptofan-sintaze bakterije <i>Pyrococcus furiosus</i>7	7
3.1.	Triptofan-sintaza	7
3.1.1.	Mehanizam katalize kemijske reakcije	8
3.1.2.	Alosterička regulacija.....	8
3.2.	Samostalna katalitička moć β podjedinice triptofan-sintaze bakterije <i>Pyrococcus furiosus</i>	9
3.2.1.	Povećana aktivnost <i>PfTrpB</i> ^{OB2} mutante dizajnirane usmjerenom evolucijom u odnosu na nativni enzim.....	9
3.2.2.	Triptofan-sintaza postiže izvanrednu specifičnost s obzirom na supstrat pomoću atipičnog mehanizma.....	13
3.2.3.	Usmjerena evolucija oponaša alosteričku aktivaciju kroz postepeno okretanje konformacijske strukture.....	15
3.2.4.	Primjena <i>PfTrpB</i> ^{OB2} mutante u stvaranju nekanonskih aminokiselina	17
4.	Budućnost i prednosti usmjerene evolucije	19
5.	Literatura	20
6.	Sažetak	22
7.	Summary.....	22

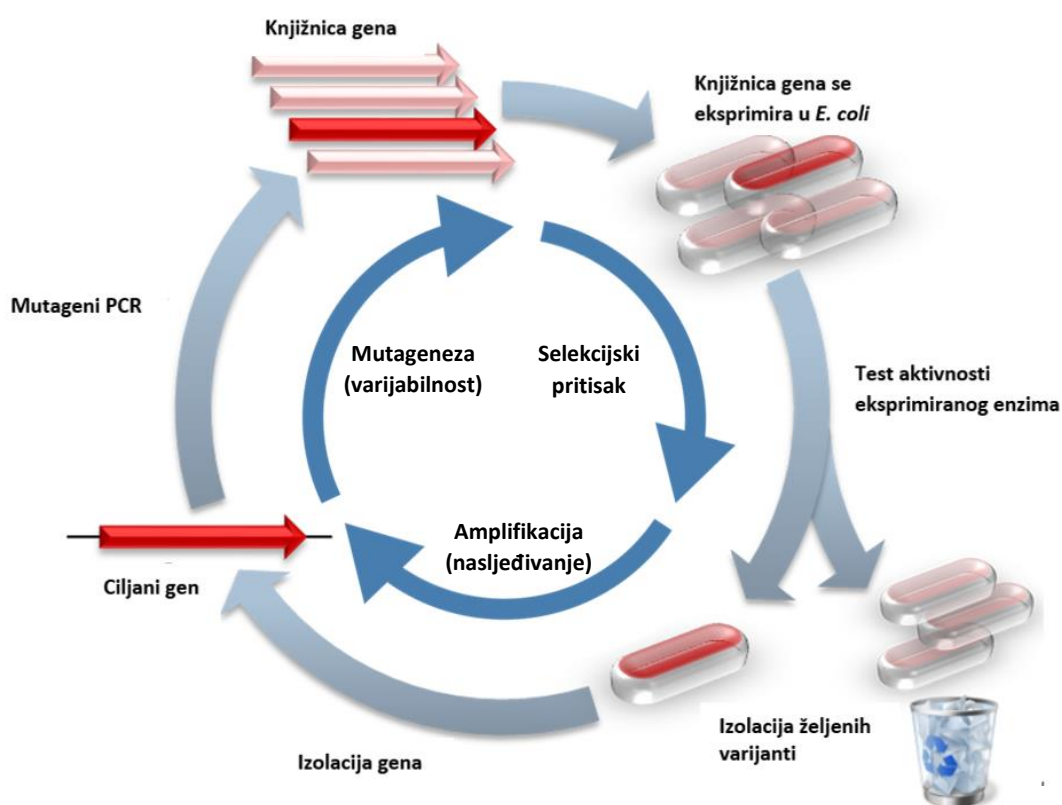
1. Uvod

Enzimi su jedne od najfascinantnijih bioloških makromolekula zbog ogromne efikasnosti i brzine kataliziranja velikog spektra kemijskih reakcija. Njihova katalitička svojstva čovječanstvo koristi u razne svrhe, kao što su biološka industrija, proizvodnja biogoriva, molekularna medicina, procesiranje i fermentiranje hrane, ali i kao sredstvo manipulacije nukleinskih kiselina u molekulskim istraživanjima (Tanokura i *sur.* 2015). Stoga je dizajn novih enzima sa superiornim svojstvima oduvijek bio jedan od vodećih izazova biokemije i biološke industrije. Iako su računalnim metodama dizajnirani mnogi enzimi, vrlo je teško dostići katalitičku moć nekih prirodno evoluiranih enzima. Posebnu zapreku čini upotreba heterodimernih enzima sa složenom alosteričkom regulacijom, čija moć drastično pada kada se katalitičke podjedinice odvoje od svojih proteinskih partnera, zbog čega se ovakvi enzimi slabo koriste u bioindustriji (Buller i *sur.* 2015). S obzirom na to da se više od 55% eukariotskih proteina sastoji od dvije ili više podjedinica, vrlo je značajno istraživati načine iskorištavanja takvih enzima (Lynch 2012). Primjer složeno alosterički reguliranog enzima je triptofan-sintaza, enzim koji sintetizira zadnji korak u biosintezi triptofana kod mnogih bakterija i kvasaca. Triptofan-sintaza je modelni alosterički sustav za istraživanje samostalne katalitičke moći izoliranih podjedinica i uz to ima veliki potencijal u stvaranju nekanonskih aminokiselina te sukladno tome i proširivanju genetičkog koda (Phillips i *sur.* 2004, Buller i *sur.* 2015).

Pristup usmjerene evolucije (engl. *directed evolution*) je metoda stvaranja novih enzima koja koristi temelje evolucije iz prirode i dovodi ih na novu razinu gdje je moguć dizajn izuzetno efikasnih enzima (Cobb i *sur.* 2013). Generiranjem mutacija i primjenom odabranog selektivnog pritiska na knjižnicu mutanata je moguće poboljšati ciljanu funkciju enzima. Svakim ciklusom usmjerene evolucije dobivamo sve efikasniji enzim. Na taj način, moguće je povećati katalitičku moć odvojenih katalitičkih podjedinica, kao kod enzima triptofan-sintaze, te potencijalno čak i nadmašiti efikasnost nativnog enzima (Buller i *sur.* 2015). Osim što omogućava iskorištavanje alosterički reguliranih enzima, usmjerenom evolucijom je moguće poboljšati računalno dizajnirane enzime što otvara razne upotrebe u sintetskoj biologiji, industriji i molekularnoj medicini (Cobb i *sur.* 2013).

2. Usmjerena evolucija kao metoda stvaranja novih enzima

Usmjerena evolucija je metoda kojom se oponašanjem prirodnog procesa evolucije mogu poboljšati svojstva nekog proteina. Uvođenjem nasumičnih mutacija u gen koji kodira ciljani protein, u više ciklusa se stvara veliki broj (knjižnica) varijantnih proteina koji u sebi nose nasumične mutacije. Metodama selekcije i provjeravanja se iz stvorene knjižnice izdvajaju oni proteini koji imaju ciljane i poboljšana svojstva čime se imitira selektivni pritisak. Nakon odabira se željeni proteini umnože, najčešće kroz ekspresiju unutar bakterija, npr. *E. coli*. Usmjerena evolucija je, uz racionalni dizajn, jedna od glavnih i najkorištenijih metoda u inženjeringu novih enzima i istraživanju principa evolucije (Cobb i sur. 2013).



Slika 2.1. Princip usmjerene evolucije enzima. Preuzeto i prilagođeno iz Shafee, 2014.

2.1. Temelji evolucije enzima

Promjena nasljednih karakteristika živog organizma kroz više generacija u vremenu se naziva evolucija (Futuyma i sur. 2017). Kako bi evolucija bila moguća unutar populacije mora postojati varijabilnost, odnosno različite varijante gena koji kodira isti protein. Varijabilnost se postiže kroz generiranje nasumičnih mutacija, homolognu rekombinaciju prilikom spolnog razmnožavanja ili genetskog protoka (engl. *gene flow*). Najčešće su promjene u samo jednom nukleotidu, te ukoliko takva mutacija nastane u protein-kodirajućem genu, može doći do promjene u strukturi i funkciji proteina. Nastale mutacije mogu djelovati na više načina. Ponekad ne donose nikakve promjene na primarnu strukturu enzima (istoznačne mutacije, engl. *sense mutation*) ili pak stvaraju enzime sa promijenjenom aminokiselinom (pogrešne mutacije, engl. *missense mutation*). Pogrešna mutacija može rezultirati smanjenom funkcijom ili potpuno nefunkcionalnim proteinom. Međutim, ponekad može prouzročiti povećanje aktivnosti ili stabilnosti proteina te samim time poboljšati njegovu funkciju (izvornu ili promiskuitetnu). Naposljetku, neke mutacije mogu stvoriti STOP kodon koji će rezultirati preuranjenim prestankom translacije i skraćenim polipeptidnim lancem (besmislene mutacije, engl. *nonsense mutation*). Glavni evolucijski mehanizam je prirodna selekcija, koja je se temelji na činjenici da organizmi s različitim svojstvima, odnosno varijacijama alela, imaju različite šanse za preživljavanje i razmnožavanje u određenoj ekološkoj niši. Prirodnom selekcijom se iz populacije izbacuju, odnosno ne razmnožavaju, jedinke čija svojstva nisu dovoljno prilagođena na određeni okoliš. S druge strane, optimalna svojstva omogućavaju jedinkama veće šanse za preživljavanje i razmnožavanje zbog čega njihov genetički materijal biva prenesen na potomstvo. Nasljeđivanjem nakupljenih mutacija u nekom protein-kodirajućem genu kroz dugi niz generacija može doći do promjene funkcije samog proteina. Uz prirodnu selekciju, važni evolucijski mehanizmi su i pristrane mutacije (engl. *biased mutation*), homologna rekombinacija, genetički pomak (engl. *genetic drift*) i genetički protok (engl. *genetic flow*) (Futuyma i sur. 2017).

2.2. Nastajanje varijacija u usmjerenoj evoluciji

Jednako kao i u evoluciji u prirodnom okolišu, početni korak usmjerene evolucije enzima je generiranje varijabilnosti početne knjižnice proteina. Stvaranje velikog broja varijantnih proteina je moguće nasumičnom mutagenezom ciljanog gena koja se najčešće provodi lančanom reakcijom polimeraze podložne pogreškama (engl. *error-prone polymerase chain reaction*) gdje se koristi DNA polimeraza koja nema provjeravajuću (engl. *proofreading*) aktivnost prilikom umnažanja DNA. Na taj način se iz početnog gena stvara veliki broj kopija u koje su nasumično unešene pogreške. Uvođenje nasumičnih točkastih mutacija ili pak rjeđe većih insercija i delecija je moguće i na druge načine, npr. pomoću transpozona ili pokretnih genetičkih elemenata. Također, generiranje varijacija je moguće uz tehnike koje oponašaju rekombinantnu aktivnost (engl. *DNA shuffling*) (Sen i sur. 2007). Transformacijom bakterija te ekspresijom nastalih genskih varijanti se dobiva veliki broj različitih proteina (knjižnica) koji se, ovisno o vrsti proteina i dostupnosti metoda selektiraju na različite načine (Sen i sur. 2007, Xiao i sur. 2014).

2.3. Selektivni pritisak na knjižnicu enzima

Iz velikog broja generiranih proteinskih varijanti neke rezultiraju smanjenim, nepromijenjenim odnosno poboljšanim svojstvima kao što su katalitička moć, stabilnost ili afinitet prema supstratu. Izdvajanje enzima s pozitivnim svojstvima iz knjižnice se provodi kroz dva glavna pristupa: selekcija (engl. *selection*) i provjeravanje (engl. *screening*) (Arnold i Georgiou 2003, Xiao i sur. 2014). Metodom selekcije se proteini s neželjenim svojstvima direktno eliminiraju kroz primjenjivanje selektivnog pritiska na knjižnicu te zadržavanjem samo onih proteina koji imaju željena svojstva. Postoji mnogo načina izvedbe metode selekcije, ali najčešće korištene su metoda prikaza (engl. *display*) i odjeljivanja (engl. *compartmentalization*). S druge strane, metodom provjeravanja se svaka varijanta zasebno eksprimira te se njezina aktivnost kvantificira, najčešće pomoću fluorescentnih boja koje nastaju razgradnjom obilježenog supstrata, čime je smanjena mogućnost gubljenja povoljnih mutanti. Naposljetku, izdvajaju se jedino one varijante koje zadovoljavaju određeni prag vrijednosti (engl. *threshold value*). Nakon izdvajanja pozitivnih varijanti, odnosno prve generacije, enzimi se mogu podvrgnuti novom ciklusu usmjerene evolucije (Xiao i sur. 2014). Tehnike selekcije i provjeravanja su u postupku usmjerene evolucije trenutno najveća zapreka zbog kompleksnosti. Naime, vrlo je teško dizajnirati visoko selektivnu metodu koja će sa

sigurnošću odabrati sve enzime sa željenom aktivnosti, a da pri tome ne odabere i enzime koji nisu zadovoljili traženi prag vrijednosti (Cobb i *sur.* 2015).

2.4. Važnost usmjerene evolucije u korištenju katalitičkih podjedinica alosterički reguliranih enzimskih kompleksa

Usmjerena evolucija je vrlo korisna pri komercijalnom iskorištavanju oligomernih enzima kao što je triptofan-sintaza čija se katalitička moć značajno smanjuje prilikom odvajanja katalitičkih od regulatornih podjedinica. Naime, uz to što je rad s oligomernim proteinima osjetljiv, ekspresija velikih proteinskih kompleksa je teret za stanicu domaćina (Buller i *sur.* 2015, Buller i *sur.* 2018). Usmjerenom evolucijom izolirane katalitičke podjednice je moguće ponovno uspostaviti ili čak povećati katalitičku aktivnost u odnosu na nativni enzim (Arnold i *sur.* 2015). Triptofan-sintaza, preciznije njezina β podjedinica, se zbog velikog potencijala u stvaranju nekanonskih aminokiselina i metaboličke važnosti koristi kao modelni enzim za poboljšanje katalitičkih funkcija kompleksno reguliranih alosteričkih enzima, koji su zbog pada efikasnosti prilikom izolacije iz kompleksa vrlo slabo korišteni kao biokatalizatori (Buller i *sur.* 2018). Usmjerena evolucija β podjednice triptofan-sintaze je detaljno opisana u 3. poglavlju.

2.5. Raznovrsne primjene usmjerene evolucije

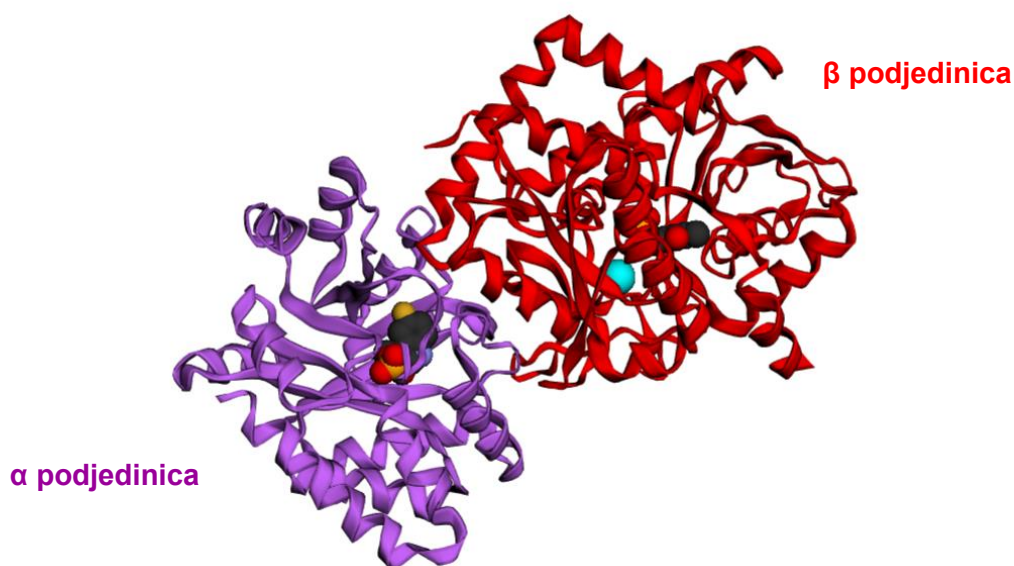
Iako je glavna tema ovog rada upravo primjena usmjerene evolucije u korištenju katalitičkih podjedinica alosterički reguliranih enzimskih kompleksa, usmjerena evolucija ima i mnoge druge primjene u molekularnoj medicini i biotehnologiji. Jako je perspektivan novi pristup terapiji malignih oboljenja, gdje su usmjerenom evolucijom dizajnirani visoko specifični onkolitički virusi koji selektivno inficiraju i liziraju stanice raka. Ovim pristupom je *in vivo* dizajniran kimerni onkolitički virus *ColoAd1*, koji u pokusima *in vitro* pokazuje značajno povećanje u selektivnosti i litičkom potencijalu prema stanicama raka debelog crijeva u odnosu na početni, nativni virus. Varijabilnost je postignuta rekombinacijom, a selektivni pritisak je bila preferentnost i selektivnost prema stanicama raka debelog crijeva (Kuhn i *sur.* 2008, Bauzon i *sur.* 2011). Ovo je zanimljiv primjer usmjerene evolucije u živom organizmu, iako je primjena *in vitro* trenutno puno više raširena. Nadalje, usmjerenom evolucijom računalno dizajnirane neefikasne retro aldolaze je kroz optimizaciju aktivnog mjesta povećana

njezina katalitičku moć čak 4,400 puta. Retro aldolaza je enzim koji katalizira cijepanje 4-hidroksi-4-(6-metoksi-2-naptil)-2-butanona do 6-metoksi-2-naptaldehoda i acetona što je čini do sada mehanistički najkompleksnijim proteinom koji su ljudi uspjeli dizajnirati. Stoga, usmjerena evolucija daje novi pristup i mogućnosti u računalnom dizajnu enzima (Giger i *sur.* 2013).

3. Usmjerena evolucija β podjedinice triptofan-sintaze bakterije *Pyrococcus furiosus*

3.1. Triptofan-sintaza

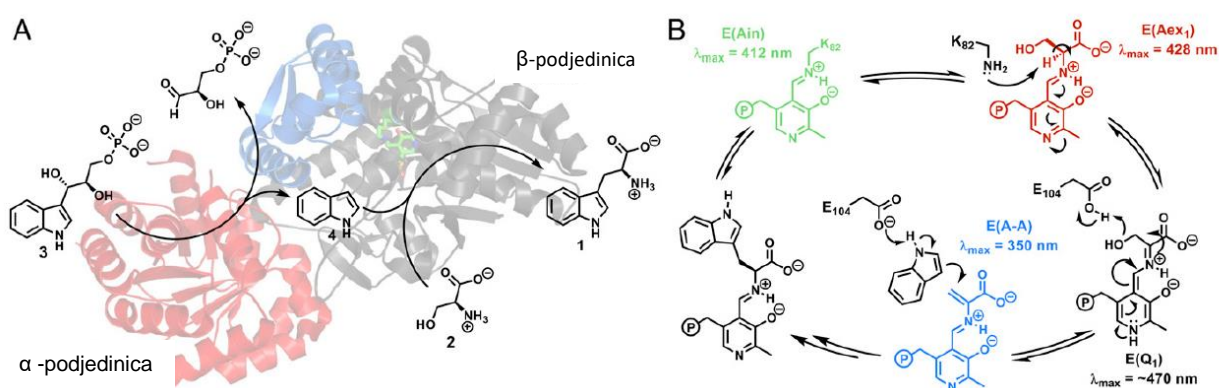
Triptofan je proteinogena, nepolarna i aromatska aminokiselina koja sadrži indolni prsten u svom bočnom ogranku. Iako je za čovjeka i druge više organizme esencijalna, neke bakterije, kvasci i biljke mogu sintetizirati triptofan iz korizmata pomoću niza enzima koji kataliziraju korake važne u navedenoj sintezi (Nelson i Cox, Dunn, 2012). Zadnji enzim u nizu biosinteze triptofana je triptofan-sintaza (TrpS) (Slika 3.1., EC 4.2.1.20) koja katalizira nastanak triptofana iz indol-3-glicerol fosfata i serina u dva koraka (Dunn, 2012). Taj enzim se sastoji od dvije podjedinice, α (TrpA) i β (TrpB) koje čine tetrahomodimer $\alpha_2\beta_2$, gdje α podjedinica katalizira nastajanje indola i gliceraldehid-3-fosfata iz indol-3-glicerol fosfata (IGP) (Slika 3.2. A), a β podjedinica kondenzaciju serina i indola uz nastajanje kvinonoidnog intermedijera pri čemu se oslobađa triptofan i molekula vode (Slika 3.2. A). Serin se na enzim kovalentno veže pomoću koenzima piridoksal-fosfata (PLP) pri čemu nastaje Schiffova baza. (Nelson i Cox, 2005, Dunn, 2012).



Slika 3.1. Kristalna struktura triptofan-sintaze (prikazan samo dimer $\alpha\beta$). PBD kod: 1a50.

3.1.1. Mehanizam katalize kemijske reakcije

Kemijski mehanizam formiranja L-triptofana u beta podjedinici enzima kondenzacijom serina i indola se odvija u više koraka te se može podijeliti u dva stupnja (Slika 3.2. B). U prvom stupnju kemijske sinteze je enzim u otvorenoj konformaciji. PLP je kovalentno vezan na amino skupinu lizina (K82) te takav spoj daje unutrašnji aldimin (engl. *internal aldimine* - E(Ain), Slika 3.2. B, zeleno). Vezanjem serina dolazi do istiskivanja lizina te nastaje vanjski aldimin (engl. *external aldimine* – E(Aex₁), Slika 3.2. B, crveno). Nastajanje E(Aex₁) dovodi do konformacijske promjene kroz komunikacijsku (COMM) (engl. *rigid-body motion of the communication*) domenu te se u aktivno mjesto pozicionira glutaminska kiselina (E104) čime enzim prelazi u poluzatvorenu konformaciju. Nakon toga dehidratacijom alfa i beta C atoma serina nastaje nestabilni kratkoživi kvinonoidni međuprodukt (engl. *quinonoid intermediate* E(Q₁)), nakon čega nastaje E(A-A) intemedijer (Slika 3.2. B, plavo) i enzim prelazi u zatvorenu konformaciju. U drugom stupnju kemijske sinteze slijedi adicija indola na nastali E(A-A) međuprodukt čime se oslobađa L-triptofan, krajnji produkt kemijske reakcije (Slika 3.2.).



Slika 3.2. A - katalitički ciklus nativnog enzima triptofan-sintaze. 1 – triptofan, 2 – serin, 3 – indol-3-glicerol fosfat, 4 - indol; B – mehanizam formiranja L-triptofana u beta podjedinici enzima. SPreuzeto i prilagođeno iz Buller i sur. 2015.

3.1.2. Alosterička regulacija

Aktivna mjesta α i β podjedinice podjedinice triptofan-sintaze su složeno alosterički regulirana. Vezanje indol-3-glicerol fosfata za α podjedinicu enzima potiče PLP-ovisno stvaranje aminoakrilata u β podjedinici, što retrogradno aktivira cijepanje IGP-a i oslobađanje indola u α podjedinici. Pri tome indol ne biva otpušten s enzima, već difundira 'tunelom'

direktno od α do β podjedinice čime se spreže otpuštanje indola i nastajanje triptofana i sukladno tome znatno povećava brzina katalize. Tunel kojim indol difundira nastaje tek kada su obje podjedinice u zatvorenoj konformaciji, čime se omogućava otpuštanje indola samo kada je to potrebno. Alosterička regulacija je moguća zbog domene COMM na β podjedinici, koja se pomiče prilikom prelaska iz otvorene u zatvorenu konformaciju ovog enzima (Buller i sur. 2015, Buller i sur. 2018, Dunn, 2012).

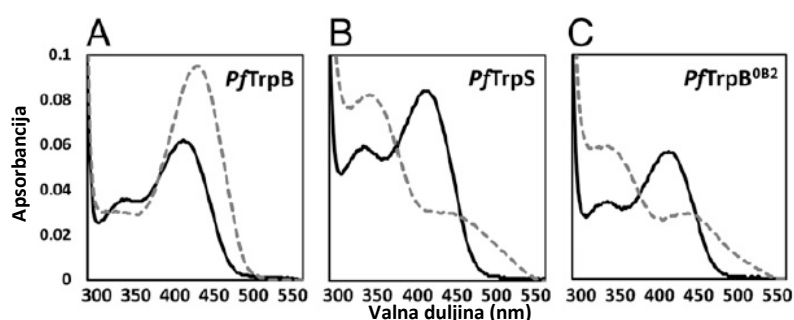
3.2. Samostalna katalitička moć β podjedinice triptofan-sintaze bakterije *Pyrococcus furiosus*

Izolacijom β podjedinice triptofan-sintaze njezina katalitička aktivnost pada za 95% u odnosu na nativni enzim zbog čega je njezina samostalna primjena vrlo neisplativa. U istraživanju iz 2015. godine Buller, Arnold i sur. su pokušali usmjerenom evolucijom dizajnirati samostalnu β podjedinicu termostabilne triptofan-sintaze iz bakterije *Pyrococcus furiosus* (*PfTrpB*) sa poboljšanom katalitičkom aktivnosti. Također, uz pomoć usmjerene evolucije su otkrili atipični mehanizam kojim triptofan-sintaza postiže neobično veliku diskriminaciju prema treoninu kao supstratu. Naposljetku, usmjerenom evolucijom *PfTrpB* je utvrđeno da aktivirajuće mutacije postepenim kinetičkim i strukturnim promjenama oponašaju složenu alosteričku aktivaciju vezanja *PfTrpA*.

3.2.1. Povećana aktivnost *PfTrpB*^{OB2} mutante dizajnirane usmjerenom evolucijom u odnosu na nativni enzim

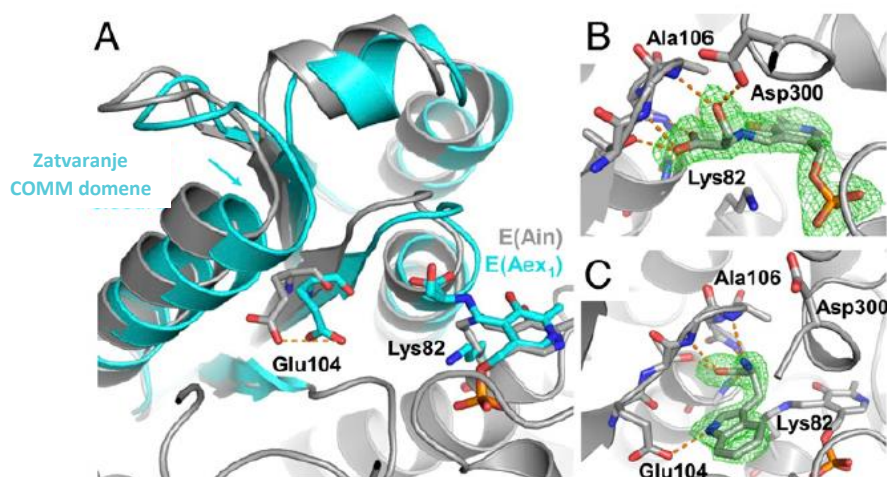
Nasumičnom mutagenezom *PfTrpB* pomoću lančane reakcije polimeraze podložne pogreškama (engl. *error-prone polymerase chain reaction*) je konstruirana knjižnica od 528 klonova enzima. U prvoj generaciji usmjerene evolucije je dobiven značajan broj (20/528) aktivirajućih mutacija, odnosno onih koje su rezultirale s barem 40% većom aktivnosti u odnosu na početnu izoliranu podjedinicu *PfTrpB*. Kombinacijom 12 najefikasnijih mutacija iz prve generacije usmjerene evolucije dobivena je *PfTrpB*^{OB2} mutanta, koja je tri puta efikasnija čak i od nativnog enzima triptofan-sintaze (Buller i sur. 2015). Usporedba spektara UV apsorpcije PLP-a za nativne i dizajnirane enzime *PfTrpS*, *PfTrpB* i *PfTrpB*^{OB2} nakon dodatka L-serina (Slika 3.3., siva linija) pokazuje zanimljivu sličnost u preferentnim međuproduktima katalize između nativnog enzima i dobivene mutante *PfTrpB*^{OB2}. Naime, *PfTrpS* pokazuje maksimum

apsorpcije oko 350 nm što odgovara nastanku E(A-A) intermedijera. S druge strane, kod izolirane *PfTrpB* se maksimum pomiče prema apsorpciji karakterističnoj za E(Aex1) intermedijera (428 nm), odnosno vanjskog aldimina. Međutim, nakon primjenjene usmjerene evolucije na *PfTrpB*, dobivenoj *PfTrp*^{OB2} mutanti se maksimum apsorpcije vraća na 350 nm, što je karakteristično za E(A-A) intermedijera, slično kao kod nativnog enzima (Slika 3.3.). Ova pojava upućuje na mogućnost da mutacije odgovorne za višestruko povećanje efikasnosti oponašaju interakcije između α i β podjedinice, odnosno mimikiraju složenu alosteričku regulaciju triptofan-sintaze (Buller i sur. 2015).



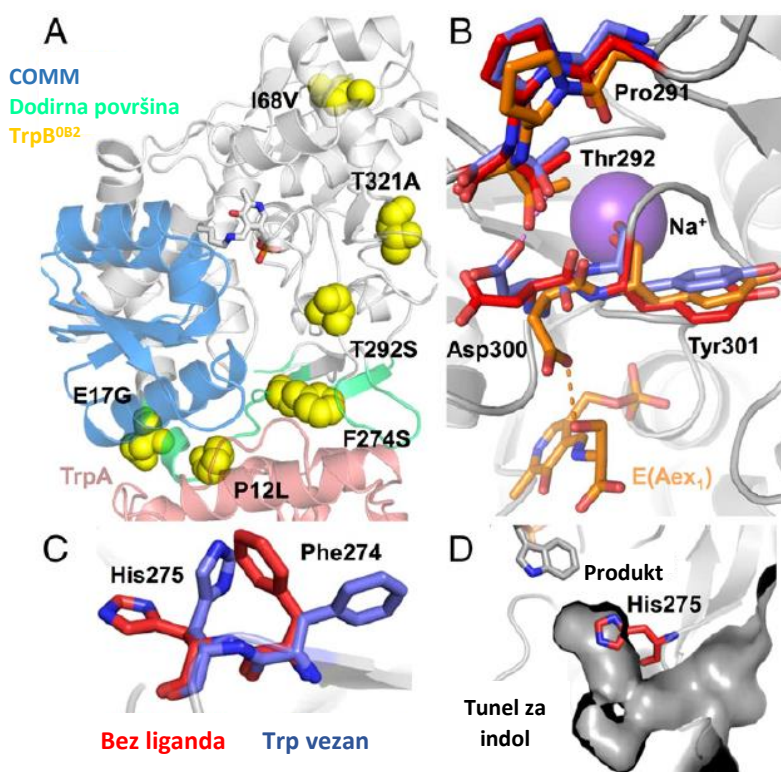
Slika 3.3. Apsorbancija UV zračenja izolirane β podjedinice *PfTrpB* (A), nativnog enzima *PfTrpS* (B) i dizajnirane β podjedinice *PfTrp*^{OB2} (C) bez dodanih supstrata (crna linija) i sa dodanim L-serinom (siva linija). Preuzeto i prilagođeno iz Buller i sur. 2015.

Kako bi se bolje razumio utjecaj mutacija na konformaciju same podjedinice, provedena je strukturna analiza *PfTrpB* (Slika 3.4.) i vizualizirana je distribucija aktivirajućih mutacija *PfTrp*^{OB2} (Slika 3.5.). Strukturna usporedba izolirane *PfTrpB* bez vezanih liganda, s vezanim L-serinom te s vezanim L-triptofanom pokazuje konformacijsku promjenu, odnosno pomak od 2.1 Å u domeni COMM prilikom stvaranja E(A-ex1) intermedijera kojom enzim prelazi u poluzatvorenu konformaciju (Slika 3.4. A, sivo – enzim bez liganda, plavo – enzim s vezanim L-serinom). Na taj način se glutaminska kiselina u aktivnom mjestu (Glu104) (Slika 3.4. A) pomiče za 3.7 Å u svoju katalitičku poziciju.



Slika 3.4. Strukturalna promjena *PfTrpB* prilikom vezanja liganda. A - pomak u domeni COMM prilikom prelaska iz $E(Ain)$ u $E(Aex_1)$. B - vezanje L-serina na *PfTrpB* ($E(Aex_1)$) (elektronska mapa gustoće Fo-Fc, pri zasićenju 3.0σ). C - vezanje L-triptofana na *PfTrpB* (elektronska mapa gustoće Fo-Fc, pri zasićenju 3.0σ). Preuzeto i prilagođeno iz Buller i sur. 2015.

Vizualizacijom distribucije aktivirajućih mutacija u *PfTrp*^{OB2} (Slika 3.5. A, žuto) je pokazano da ih se većina nalazi u domeni COMM (Slika 3.5. A, plavo). Posebno je važna T292S mutacija koja samostalno povećava aktivnost enzima čak 20 puta čime može povratiti aktivnost nativnog enzima. Prekidanjem vodikove veza između asparaginske kiseline (Asp300) i $E(Aex_1)$ intermedijera (Slika 3.5. B) se omogućuje interakcija T292 s D300 koji se nalaze u blizini monovalentnog kationa za kojeg je poznato da sudjeluje u ostvarivanju interakcija između α i β podjedinice. Također, većina aktivirajućih mutacija se nalaze u blizini regije koja graniči sa α podjedinicom u nativnom enzimu, što također ukazuje na moguću mimikriju alosteričke aktivacije α podjedinicom (Buller i sur. 2015).

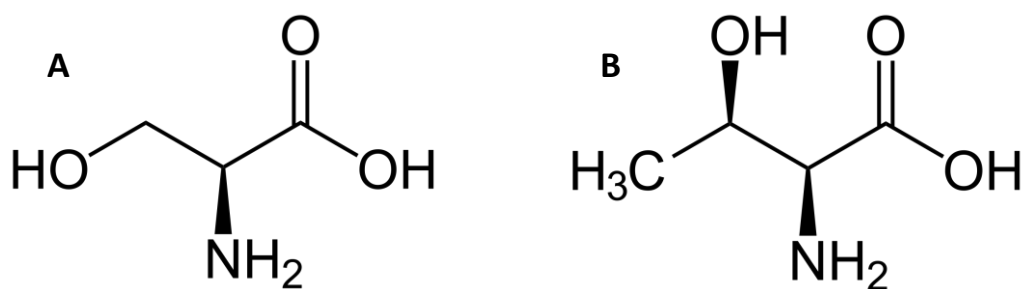


Slika 3.5. Distribucija aktivirajućih mutacija u *PfTrp*^{OB2}. A – plavo: domena COMM, zeleno: dodirna površina α i β podjedinice, žuto: aktivirajuće mutacije *PfTrp*^{OB2}, crveno: regija 5A udaljena od *PfTrpA*; B - vodikova veza između asparaginske kiseline (Asp300) i E(Aex₁) intermedijera koja nastaje tokom katalitičkog ciklusa; C - rotacija histidina (His275) i fenilalanina (Phe274) prilikom nastanka otvorene konformacije enzima; D – u zatvorenoj konformaciji enzima histidin (His275) blokira aktivno mjesto *PfTrp*. Preuzeto i prilagođeno iz Buller i sur. 2015.

Analiza apsorpcije UV svjetla i strukture nativnog enzima, izolirane *PfTrpB* i dizajnirane *PfTrpB*^{OB2} upućuju na mogućnost da nastale mutacije oponašaju alosteričke interakcije s α podjedinicom te favoriziraju prelazak enzima u zatvorenu konformaciju. Zanimljivo je da dodatkom *PfTrpA* podjedinice na *PfTrpB*^{OB2} mutantu značajno inhibirala aktivnost mutante. Moguće je da je *PfTrpA* svojim vezanjem na β podjedinicu poremetila novonastalu alosteričku mimkriju (Buller i sur. 2015).

3.2.2. Triptofan-sintaza postiže izvanrednu specifičnost s obzirom na supstrat pomoću atipičnog mehanizma

Većina enzima koji koriste aminokiseline kao supstrate ih razlikuju na temelju njihove veličine ili pak različitih ogranaka koji zbog svog drugačijeg elektronskog sastava ne pristaju u aktivno mjesto u pravoj poziciji potrebnoj za katalizu. Posebno je izazovna diskriminacija aminokiselina kao npr. serin i treonin kojima su veličina i obrazac elektronskog oblaka koji okružuje aminokiselinu vrlo slični (Slika 3.6.).



Slika 3.6. A - struktura serina; B - struktura treonina. Preuzeto s:

<https://commons.wikimedia.org/wiki/User:NEUROtiker>

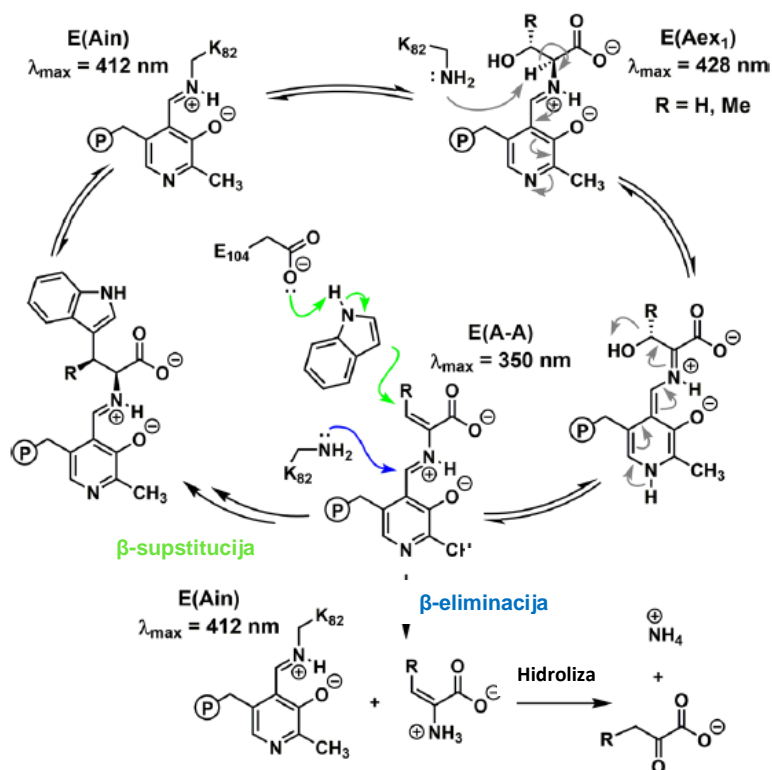
U istraživanju koje su proveli Buller i *sur.* u 2018 je pokazano da nativni enzim TrpS može s visokom efikasnošću katalizirati reakciju s L-treoninom (Thr) i IGP čime nastaje (2S,3S)- β -metiltriptofan (β -MeTrp). Efikasnost korištenja treonina kao supstrata *Pf*TrpS samo je 3.4 puta manja od korištenja serina. Međutim, u direktnoj kompeticiji treonina i serina enzim ima 82000 puta veći afinitet za serin, te čak i pri 1000 puta većoj koncentraciji treonina, serin je svejedno preferentni supstrat te nastaje isključivo triptofan (Tablica 3.1.). Postavlja se pitanje zbog čega dolazi do tako velike specifičnosti za serin u direktnoj kompeticiji, unatoč tome što je katalitička efikasnost reakcije s treoninom relativno velika. Treba primijetiti da je K_M za indol u reakciji sa serinom 20 μ M, dok je u reakciji s treoninom čak 1400 μ M. Ovo je važno jer se standardno mjerenje katalitičke efikasnosti (k_{cat}/K_M) uobičajeno vrši u uvjetima zasićenja indolom te se ne zamjećuje ovaj efekt, jer reakcija postaje pseudo-prvog reda u odnosu na serin ili pak treonin. Iz ovih kinetičkih podataka je vidljivo da je u reakciji s treoninom potrebno značajno više indola za postizanje zasićenja u izoliranoj beta reakciji (Tablica 3.1.).

Tablica 3.1. Kinetički parametri *P. furiosus* TrpS. Preuzeto i prilagođeno iz Buller i sur. 2016.

Supstrat	K_{cat} (β - supstitucija) (s^{-1})	K_{cat} (β -eliminaciju) (s^{-1})	K_M (amino- kiselina) (mM)	K_M (indol) (μM)	K_{cat}/K_M (amino- kiselina) ($M^{-1} s^{-1}$)	K_{cat}/K_M (indol) ($M^{-1} s^{-1}$)	Efikasnost uparivanja (%)	Efikasnot uparivanja (%)
L-serin	1.0 ± 0.1	0.055 ± 0.002	0.6 ± 0.1	20 ± 2	1600	50000	>99	>99
L-treonin	0.61 ± 0.04	0.47 ± 0.04	1.3 ± 0.2	1400 ± 300	470	460	65 ± 10	17 ± 3

Kako bi se ispitale razlike u reakcijama sa serinom i treoninom, provedena je reakcija sinteze triptofana iz IGP u prisutnosti toluena, koji može „uhvatiti“ indol ako se otpušta iz aktivnog mjesta enzima u otopinu tijekom katalitičkog ciklusa. Na taj način je utvrđeno dolazi li do disocijacije indola s alfa podjedinice prije nego se provede drugi korak katalize, ili pak indol putuje intramolekulskim tunelom i direktno se kondenzira sa serinom ili treoninom. U reakciji sa serinom indol je direktno prenesen bez otpuštanja u otopinu te je izravno ugrađen u nastali triptofan. S druge strane, u reakciji s treoninom samo 17% indola nastalog iz IGP-a je ugrađeno u nastali β -MeTrp. Prema tome, pri nastajanju indola iz IGP-a, on većinom disocira sa enzima ukoliko je u beta podjedinici vezan treonin. Za razliku, vezani serin djeluje na sprežanje nastajanja indola i njegove kondenzacije na beta podjedinici tj. indol ne disocira u otopinu već difundira intramolekulskim tunelom koji nastaje kada su obje podjedinice nativnog enzima u zatvorenoj konformaciji, što uvelike povećava brzinu reakcije. Prema tome, vezanje treonina smanjuje efikasnost iskorištavanja nastalog indola. Također, vezanje treonina nepovoljno djeluje na alosteričku regulaciju i komunikaciju između podjedinica što rezultira velikom kinetičkom prednosti serina u donosu na treonin u direktnoj kompeticiji. Nadalje, u aktivnom mjestu je moguće pomoću lizina (Slika 3.7., K82) postići abortivnu deaminaciju, čime se oslobađa dehidroalanin koji se razgrađuje do amonijaka i alfa ketonske kiseline. Razgradnja treonina ovakvim oblikom deaminacije je u kompeticiji s beta substitucijom (Slika 3.7. zeleno) te je 8.5 puta veća za treonin nego za serin. To ukazuje na kratak život elektrofilnog intermedijera koji nastaje u reakciji s pogrešnom aminokiselinom, uslijed njegove hidrolize u aktivnom mjestu, što je moguć mehanizam popravka pogreške. Međutim, aminokrotonat koji nastaje ovim procesom je vrlo toksičan zbog čega bi bio prevelik teret na stanicu *in vivo*. Stoga, malo je vjerojatno da se u staničnim uvjetima preferira hidroliza intermedijera kao mehanizam ostvarivanja specifičnosti prema treoninu, već je za tako veliku specifičnost vjerojatnije

odgovorno ostvarivanje alosteričke regulacije između podjedinica koje rezultira smanjenim afinitetom enzima za indol, kao i smanjenom spregom katalitičkog ciklusa.



Slika 3.7. Katalitički ciklus triptofan-sintaze za β -supstituciju i β -eliminaciju. Preuzeto i prilagođeno iz Buller i sur. 2016.

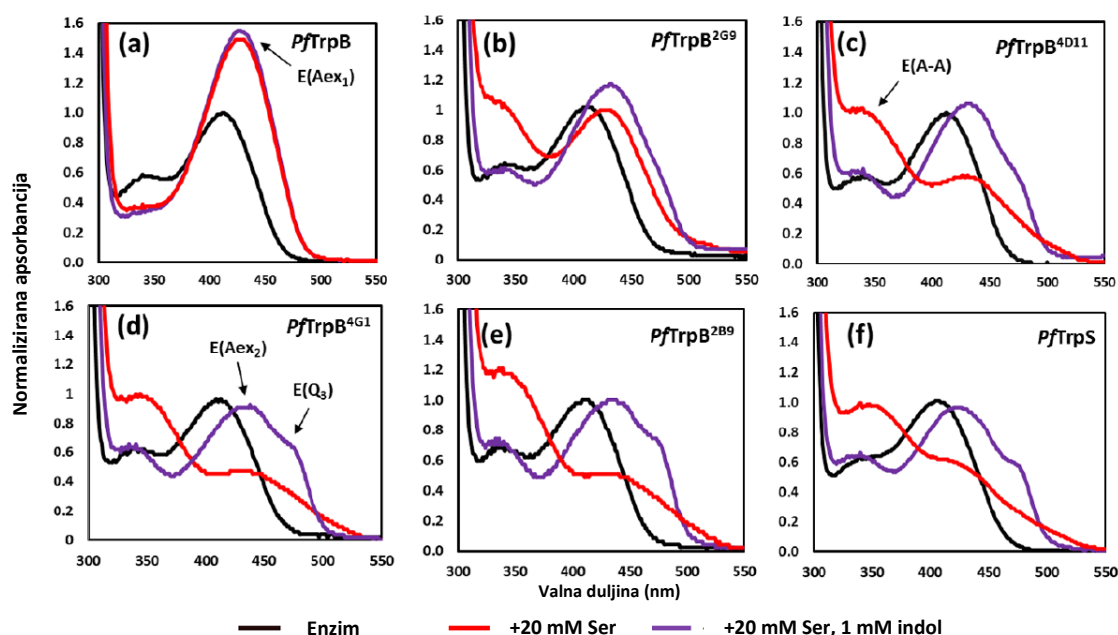
3.2.3. Usmjerena evolucija oponaša alosteričku aktivaciju kroz postepeno okretanje konformacijske strukture

Kako bi se pobliže ispitao mehanizam koji serin čini preferentnim supstratom dizajnirana je mutanta *PfTrp*^{2B9} u četiri koraka usmjerene evolucije. U prva dva koraka je selektivni pritisak bila efikasnost reakcije sa serinom i indolom (nastale su mutante *PfTrp*^{2G9} i *PfTrp*^{D11}), a u trećem i četvrtom je selektivni pritisak bila efikasnost reakcije s treoninom i indolom (nastale su mutante *PfTrp*^{4G1} i *PfTrp*^{2B9}). Za svaki pojedini enzim svakog koraka usmjerene evolucije su mjereni različiti biokemijski parametri te je uočeno da se svakim korakom usmjerene evolucije postepeno pomiče ograničavajući korak kemijske reakcije

(Tablica 3.2.). U *PfTrpB* je korak koji ograničava kemijsku reakciju nastajanje vanjskog aldimina E(Aex1), dok je kod nativnog enzima, kojem je beta podjedinica (*PfTrpB*) alosterički aktivirana, drugi korak katalize ograničavajući. Spektrofotometrijskom analizom mutanata nastalih tijekom svakog ciklusa usmjerene evolucije je utvrđeno da se obrazac produkata svakim korakom sve više približava onome od nativnog enzima, gdje je beta podjedinica alosterički aktivirana s alfa podjedinicom (Slika 3.8.). Već prvim evolucijskim ciklusom, odnosno samostalnom mutacijom T292S dolazi do velikog pomaka u ograničavajućem koraku kemijske reakcije prema drugom koraku katalize, što ga čini bližim ponašanju alosterički aktivirane beta podjedinice u nativnom enzimu. Svakim daljnjim ciklusom usmjerene evolucije, dolazi do još većeg pomaka ograničavajućeg koraka reakcije prema drugom stupnju katalize što upućuje na to da nastale mutacije postepeno sve intenzivnije oponašaju složenu alosteričku aktivaciju koja je posljedica vezanja alfa podjedinice. Koraci koji ograničavaju ukupnu brzinu kemijske reakcije su određeni kinetičkim izotropnim efektom. Spektrofotometrijskom analizom mutanata svakog koraka usmjerene evolucije je utvrđeno da se obrazac produkata svakim korakom sve više približava onome od nativnog enzima, gdje je beta podjedinica alosterički aktivirana s alfa podjedinicom (Slika 3.8.).

Tablica 3.2. Biokemijski parametri nativnog, dizajniranog i alosterički aktiviranog *PfTrpB* enzima. Preuzeto i prilagođeno iz Buller i *sur.* 2018.

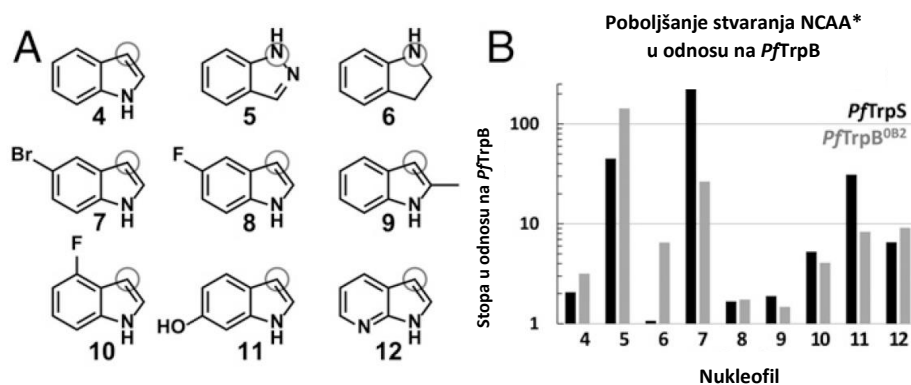
enzim	Dodatne mutacije	k_{cat} (s^{-1})	K_M L-Ser (mM)	K_M indol (μM)	k_{cat}/K_M L-Ser ($M^{-1} s^{-1}$)	k_{cat}/K_M indol ($M^{-1} s^{-1}$)	Kinetički izotopni efekt	K_D L-Trp (μM)
PfTrpB	/	0.31 ± 0.02	1.2 ± 0.2	80 ± 10	260	3900	2.77 ± 0.09	1200 ± 250
PfTrp^{B2G9}	T292S	1.1 ± 0.2	0.84 ± 0.04	14 ± 3	1300	7800	1.46 ± 0.08	168 ± 12
PfTrp^{B4D11}	E17G, I68V, F274S, T321A	2.2 ± 0.2	1.2 ± 0.2	11 ± 2	1800	200 000	1.37 ± 0.08	30 ± 4
Pf TrpB^{4G1}	F95L	1.3 ± 0.05	0.45 ± 0.08	<10	2900	>130 000	1.17 ± 0.11	16 ± 1
Pf TrpB^{2B9}	I16V, V384A	0.94 ± 0.02	0.34 ± 0.03	<10	2800	>94 000	1.12 ± 0.03	13 ± 1
PfTrpS	N/A	1.0 ± 0.1	0.6 ± 0.1	20 ± 2	1600	50 000	1.01 ± 0.04	<10



Slika 3.8. Distribucija *PfTrpB* katalitičkih intermedijera u ustaljenom stanju. Crna linija – spektar prije dodavanja supstrata, a λ_{\max} odgovara E(Ain). Kataliza je inicirana sa 20 mM serinom i 1 mM indolom. Krajnja distribucija ustaljenog stanja je prikazana ljubičastom linijom. Indol je potrošen kroz 1-2 minute te je rezultirajuća raspodjela prikazana ljubičasto. Spektar je napravljen pri 20 μ M enzima i 0.2 M puferu natrijeva fosfata (pH 8.0). Vrijednosti su normalizirane na maksimalnu apsorbanciju E(Ain) na 412 nm radi jednostavnosti. Preuzeto i prilagođeno iz Buller i *sur.* 2018.

3.2.4. Primjena *PfTrpB*^{OB2} mutante u stvaranju nekanonskih aminokiselina

Triptofan-sintaza je promiskuitetan enzim zbog čega ima veliki potencijal u dizajnu nekanonskih aminokiselina, donosno analoga triptofana koji su ključni u sintetskoj biologiji i širenju genetičkog koda (Phillips 2004, Buller i *sur.* 2015). Nekanonske aminokiseline također mogu sudjelovati u stvaranju raznih farmaceutika (Barry i *sur.* 2012). Dodavanjem raznih analoga supstrata je testiran potencijal dizajnirane *PfTrpB*^{OB2} mutante za stvaranje nekanonskih aminokiselina. Prilikom korištenja derivata indola kao što je 5-bromoindol kao analognih supstrata, u *PfTrpB*^{OB2} je došlo do značajnog povećanja efikasnosti u usporedbi s nativnim kompleksom triptofan-sintaze (Slika 3.9.). Stoga, ova mutanta ima potencijalnu primjenu sintezi nekanonskih aminokiselina (Buller i *sur.* 2015).



Slika 3.9. Profili upotrebe supstrata za nativni i dizajnirani *PfTrpB* enzim. A - analozi indola za koje je poznati da reagiraju s *StTrpB* enzimom. Nukleofilni atom je zaokružen sa sivim krugom. B - relativne aktivnosti *PfTrpS* (crno) i *PfTrpB*^{0B2} (sivo) u usporedbi s *PfTrpB*. Reakcije su provedene s 20 mM koncentracijom svakog supstrata i varirajućim koncentracijama enzima kako bi se osigurala nepotpuna konverzija nakon 1 sata. *Nekanonska aminokiselina (engl. *non-canonical amino acid*, *NCAA*). Preuzeto i prilagođeno iz Buller i *sur.* 2015.

4. Budućnost i prednosti usmjerene evolucije

Usmjerena evolucija je vrlo moćna i fleksibilna metoda za dizajn novih enzima. Enzimi dizajnirani usmjerenom evolucijom uvelike doprinose medicini i biološkoj industriji. Također, omogućili su provedbu evolucije u stvarnom vremenu što je od izuzetne značajnosti za istraživanja evolucijske biologije (Cobb i *sur.* 2013). Najveća prednost usmjerene evolucije je da nasumičnim stvaranjem varijacija često dizajnira aktivirajuće mutacije koje ne bi bile očite metodama racionalnog dizajna kojima danas raspolažemo. Kao što je pokazano na primjeru triptofan-sintaze, ponekad naočigled nije potpuno razumljivo na koji način aktivirajuće mutacije povećavaju katalitičku aktivnost enzima. Međutim, upravo istraživanjem kinetičkih i strukturnih svojstava dobivenih mutanata se saznaje puno o mehanizmu katalize, selektivnosti prema supstratu, ali i načinima regulacije istraživnog enzima.

Iako je većina usmjerene evolucije danas fokusirana na dizajn novih enzima, novi pristupi koji imaju potencijal proširenja u budućnosti su usmjerena evolucija genoma i metaboličkih puteva. Već su razvijene metode *in vivo* usmjerene evolucije genoma nekih virusa, bakterija i kvasaca. Vrlo zanimljivo područje u budućnosti bi mogla postati i usmjerena evolucija mikrobnih zajednica, kao npr. crijevnog mikrobioma. Kao što je već spomenuto, usmjerena evolucija je od izuzetnog značaja u sintetskoj biologiji te se isti trend očekuje i u budućnosti istraživanja na proširivanju genetičkog koda.

5. Literatura

- Arnold F. H., Georgiou G.: *Directed enzyme evolution: Screening and selection methods*. Methods in molecular biology (2003)
- Barry S. M., Kers J. A., Johnson E. G., Song L., Aston P. R., Patel B., Krasnoff S. B., Crane R. B., Gibson D. M., Loria R., Challis G. L.: *Cytochrome P450–catalyzed L-tryptophan nitration in thaxtomin phytotoxin biosynthesis* (2012)
- Bauzon M., Hermiston T. W.: *Oncolytic Viruses: The Power of Directed Evolution* (2012)
- Buller A. R., Roye P., Cahn J. K. B., Scheele R. A., Herger M., Arnold F.H.: *Directed Evolution Mimics Allosteric Activation by Stepwise Tuning of the Conformational Ensemble* (2018)
- Buller A. R., Roye P., Murciano-Calles J., Arnold F. H. : *Tryptophan Synthase Uses an Atypical Mechanism To Achieve Substrate Specificity* (2016)
- Buller A. R., Brinkmann-Chen S., Romney D. K., Herger M., Murciano-Calles J., and Arnold F. H.: *Directed evolution of the tryptophan synthase β -subunit for stand-alone function recapitulates allosteric activation* (2015)
- Cobb R. E., Chao R., Zhao H.: *Directed Evolution: Past, Present and Future* (2013)
- Dunn M. F.: *Allosteric Regulation of Substrate Channeling and Catalysis in the Tryptophan Synthase Bienzyme Complex* (2012)
- Futuyma D. J., Kirkpatrick M.: *Evolution* (2017), Sinauer Associates
- Giger L., Caner S., Obexer R., Kast P., Baker D., Ban N., Hilvert D.: *Evolution of a designed retro-aldolase leads to complete active site remodeling* (2013)
- Kuhn I., Harden P., Bauzon M., Chartier C., Nye J., Thorne S., Reid T., Ni S., Lieber A., Fisher K., Seymour L., Rubanyi G. M., Harkins R. N., Hermiston T. W.: *Directed Evolution Generates a Novel Oncolytic Virus for the Treatment of Colon Cancer* (2008)
- Lyle N., Das R. K., Pappu R.V.: *A quantitative measure for protein conformational heterogeneity* (2013)
- Lynch M.: *The Evolution of Multimeric Protein Assemblages* (2012)

- Nelson D. L., Cox M. M.: *Lehninger Principles of Biochemistry* 4th edition (2005)
- Phillips R. S.: *Synthetic applications of tryptophan synthase* (2004)
- Sen S., Dasu V. V., Mandal B.: *Developments in Directed Evolution for Improving Enzyme Functions* (2007)
- Shafee T.: *Evolvability of a viral protease: experimental evolution of catalysis, robustness and specificity* (2014)
- Tanokura M., Miyakawa T., Guan L., Hou F.: *Structural analysis of enzymes used for bioindustry and bioremediation* (2015)
- Xiao H., Bao Z., Zhao H.: *High Throughput Screening and Selection Methods for Directed Enzyme Evolution* (2014)
- <https://commons.wikimedia.org/wiki/User:NEUROtiker>

6. Sažetak

Enzimi su jedne od najfascinantnijih bioloških makromolekula zbog ogromne efikasnosti i brzine kataliziranja velikog spektra kemijskih reakcija. Zbog raznovrsnih upotreba enzima u bioindustriji i molekularnoj biologiji, dizajn novih visokoefikasnih enzima je vrlo značajno područje istraživanja. Osobito je izazovno iskorištavanje oligomernih enzima sa složenom alosteričkom regulacijom čija moć drastično pada kada se katalitičke podjedinice odvoje od svojih proteinskih partnera. Modelni enzim za istraživanje alosterički reguliranih proteina je triptofan-sintaza, enzim koji sintetizira zadnji korak u biosintezi triptofana kod mnogih bakterija i kvasaca. Usmjerena evolucija je pristup dizajnu enzima s poboljšanim svojstvima koji se temelji na generiranju varijabilnosti i primjeni odabranog selektivnog pritiska. Ovim pristupom je dizajnirana samostalna katalitička beta podjedinica triptofan-sintaze koja ima veliki potencijal u sintezi nekanonskih aminokiselina.

7. Summary

Enzymes are one of the most fascinating macromolecules due to their high efficiency and broad range of catalytic abilities. Since enzymes have numerous applications in bioindustry and molecular biology, design of highly efficient enzymes is a significant area of research. Usage of oligomeric enzymes with complex allosterical regulation turned out to be especially challenging since catalytic power of the subunits drops dramatically when they are separated from their protein partners. A model enzyme for allosterically regulated enzymes is tryptophan synthase, which catalysis the last step in tryptophan biosynthesis in numerous bacteria and yeasts. Directed evolution is a novel approach in enzyme design that combines generation of genetic variations with use of defined selective pressure to generate protein library. By applying directed evolution, group of scientists succeeded in optimizing tryptophan synthase beta subunit to have stand-alone catalytic power.